

ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора биологических наук Макаровой Марины Витальевны на диссертационную работу Вязовой Анны Александровны на тему: «Генетическая структура популяции и множественная лекарственная устойчивость *Mycobacterium tuberculosis*», представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.11 – микробиология

Актуальность темы выполненной работы

Туберкулез (ТБ) – по-прежнему тяжелая инфекция, входит в десятку основных причин смертности во всем мире. Распространение возбудителя туберкулеза – *M. tuberculosis* с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ) и широкой лекарственной устойчивостью (ШЛУ) затрудняет борьбу с заболеванием и создает более сложную ситуацию. Повышенный риск возникновения лекарственной устойчивости возбудителя часто объясняется неадекватным использованием антибактериальных препаратов и недостаточным осуществлением мер инфекционного контроля. В настоящее время в схемы лечения МЛУ-ТБ включены новые противотуберкулезные препараты – бедаквилин, линезолид, деламаид, но уже появляются сообщения о формировании устойчивости и к ним. Это требует постоянного изучения «эволюции» возбудителя, в том числе мониторинга геномных мутаций *M. tuberculosis*. Генетическое разнообразие возбудителя все чаще признается как играющее важную роль в развитии и исходе туберкулезной инфекции, является важным фактором патогенеза, который может влиять на вирулентность, трансмиссивность, реакцию хозяина и возникновение лекарственной устойчивости.

Поскольку микобактерии туберкулеза передаются преимущественно воздушно-капельным путём, наиболее опасными резервуарами и источниками инфекции являются больные туберкулёзом лёгких с наличием бактериовыделения

и/или с деструктивными процессами в лёгочной ткани. МЛУ/ШЛУ-ТБ легких в большинстве случаев проявляется обширными деструктивными и хроническими формами с массивным бактериовыделением. И чем больше больных, выделяют резистентные *M. tuberculosis*, тем больше риск передачи устойчивых штаммов здоровым людям и появления новых случаев ТБ с первичной резистентностью возбудителя. Поэтому показатели первичной лекарственной устойчивости *M. tuberculosis* отражают не только общую ситуацию с выявлением и лечением ТБ, но и степень изоляции бактериовыделителей и санитарно-гигиенические аспекты профилактической работы, т.е. позволяют оценить степень напряженности эпидемической ситуации по туберкулезу.

В этой связи, диссертационная работа Вязовой А.А., посвященная изучению генетического разнообразия, мутаций, определяющих устойчивость к противотуберкулезным препаратам и распространенности генотипов, ассоциированных с первичной множественной лекарственной устойчивостью штаммов, в популяции *M. tuberculosis* на Северо-Западе России, является крайне важной и актуальной.

Степень новизны исследования, обоснованность научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Новизна представленных результатов обусловлена, в первую очередь, масштабностью исследования. Так автором получены новые данные молекулярно-генетического мониторинга эпидемиологии *M. tuberculosis*. Показано, что в структуре изученной популяции *M. tuberculosis* доминируют штаммы современной сублинии генетического семейства Beijing, принадлежащие к глобально распространенным генотипам B0/W148 и Central Asian/Russian (субтип CAO, впервые выявленный на территориях Северо-Запада России). Впервые в популяции *M. tuberculosis* на Северо-Западе России выявлены ассоциированные с множественной лекарственной устойчивостью кластеры 1065-32 Central Asian/Russian, 1071-32 древней сублинии Beijing и SIT262/Ural, представляющие

потенциальную эпидемическую опасность. Автором выявлены новые профили сполиготипирования *M. tuberculosis*, ранее неизвестные в России и за ее пределами, и депонированы в международную базу данных SITVIT2.

Впервые на основе мультиплексной ПЦР разработаны способы установления принадлежности штаммов *M. tuberculosis*: к современной или древней филогенетическим сублиниям генотипа Beijing, к генотипу Central Asian/Russian Beijing (другое наименование – кластер 94-32), к кластеру 1071-32 древней сублинии Beijing, к субтипу CAO Beijing. Уникальность данных способов определения генотипов, кластеров и субтипов подтверждена патентами РФ. Впервые предложен алгоритм генотипирования штаммов *M. tuberculosis* при проведении молекулярно-эпидемиологического мониторинга микробных популяций, включающий разработанные способы.

Получены новые для Российской Федерации данные, пополняющие современные представления о спектре мутаций в генах *mmpR5* (Rv0678) и *atpE* (Rv1305), определяющих устойчивость *M. tuberculosis* к бедаквину. Показано, что устойчивость к бедаквину у штаммов *M. tuberculosis* B0/W148 и CAO ассоциирована с мутациями в различных участках гена *mmpR* (Rv0678), обеспечивающих выведение препарата из микробной клетки.

Созданы электронные информационные базы данных («Сполигопрофили *Mycobacterium tuberculosis* на Северо-Западе России» и «Сполигопрофили штаммов *Mycobacterium tuberculosis*, циркулирующих в Республике Коми»), включающие уникальные характеристики штаммов (сполиготип, принадлежность к генетическому семейству, профиль фенотипической устойчивости к противотуберкулезным препаратам), которые могут применяться для сравнительного анализа популяций *M. tuberculosis*.

Теоретическая и практическая значимость диссертационной работы

Результаты, полученные автором, имеют существенное теоретическое и практическое значение. Теоретическая значимость работы заключается в том, что

результаты исследования вносят весомый вклад в понимание распространенности штаммов различных генетических семейств (генотипов) и кластеров в популяции *M. tuberculosis* в Северо-Западном федеральном округе России. Получены новые знания о генетическом разнообразии и детерминантах устойчивости возбудителя к противотуберкулезным препаратам. Приведены факты, доказывающие неравномерность распределения генотипов в гетерогенных популяциях *M. tuberculosis* в субъектах Северо-Западного федерального округа. Установлены связи между первичной множественной лекарственной устойчивостью, ассоциированной с определенным спектром мутаций, и принадлежностью штаммов *M. tuberculosis* к различным генотипам, что позволяет оценить клиническую и эпидемиологическую значимость возбудителя.

Практическая значимость, полученных результатов Вязовой А.А., заключается в возможности применения как предложенного алгоритма генотипирования штаммов *M. tuberculosis*, так и разработанных способов быстрого выявления основных генотипов и кластеров современной и древней сублиний *M. tuberculosis* Beijing, для слежения за циркуляцией штаммов определенных генотипов и характеристики динамики пространственно-временной структуры популяции *M. tuberculosis*.

Разработанные электронные базы данных применимы для накопления и сравнительного анализа информации о генотипах штаммов и проведения молекулярно-генетического мониторинга популяции *M. tuberculosis*. Депонирование полногеномных последовательностей серийных изолятов *M. tuberculosis* в международных банках данных, таких как GenBank, играет важную роль в распространении и обмене информацией в области туберкулеза.

Сформированная коллекция ДНК штаммов, представляющих различные генетические семейства, линии/сублинии и кластеры, может быть использована для исследования геномики и протеомики *M. tuberculosis* и оценки эффективности новых противотуберкулезных соединений. Результаты диссертационного

исследования успешно внедрены и применяются в практической деятельности бактериологической лаборатории и в образовательном процессе Учебного отдела ФГБУ «Санкт-Петербургский НИИ фтизиопульмонологии» Минздрава России, в курсе лекций на кафедрах эпидемиологии, общественного здоровья и здравоохранения ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Минздрава России, на кафедре фтизиопульмонологии ФГБОУ ВО «Северный государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Архангельск, в образовательном процесс на кафедре поликлинической терапии и профилактической медицины с курсом общественного здоровья и здравоохранения ФГБОУ ВО «Бурятский государственный университет имени Доржи Банзарова» и в работе микробиологической лаборатории ГБУЗ «Республиканский клинический противотуберкулезный диспансер имени Галины Доржиевны Дугаровой», г. Улан-Удэ.

Достоверность и апробация результатов исследования, в том числе публикации в рецензируемых изданиях

Достоверность полученных автором результатов работы не вызывает сомнений, определяется логически выстроенным планом исследования, направленным на решение поставленных задач, с использованием комплекса лабораторных методов (включая полногеномное секвенирование). Репрезентативность выборок штаммов и большой объем исследований – достаточный для корректной статистической обработки данных, с применением специализированного программного обеспечения и международных баз данных, позволяют считать результаты работы достоверными.

Результаты диссертационной работы Вязовой А.А. доложены и обсуждены на 28 конгрессах и конференциях международного и всероссийского уровней. Основное содержание работы отражено в 59 печатных работах, в том числе в 34 статьях в рецензируемых изданиях, в четырех патентах на изобретение. Получено два свидетельства о регистрации базы данных.

Оценка содержания, завершенности и оформления диссертации

Диссертационная работа Вязовой А.А. представлена на 277 страницах машинописного текста по традиционному плану и включает введение, обзор литературы, пять глав собственных исследований, заключение, выводы, практические рекомендации, перспективы дальнейшей разработки темы, список сокращений, список литературы и четыре приложения, иллюстрирована 89 таблицами и 39 рисунками.

Во введении автор показывает актуальность проблемы, степень разработанности темы, формулирует цель, задачи исследования, научную новизну, теоретическую и практическую значимость работы. Материалы и методы изложены достаточно четко, что позволяет объективно оценить объем и глубину исследования. Приведены сведения о личном вкладе автора, сформулированы основные положения, выносимые на защиту, обоснована достоверность полученных результатов и приведены данные апробации результатов исследования.

Первая глава представляет обзор актуальных источников литературы с цитированием 85 отечественных и 253 иностранных источников, где представлены современные данные о биологии возбудителя туберкулеза, описаны методы генотипирования *M. tuberculosis*, приведены имеющиеся сведения по молекулярно-эпидемиологическим исследованиям при туберкулезе на различных территориях России. Обзор написан четко, раскрывает актуальность темы и затрагивает нерешенные проблемы в этой области.

Раздел «Результаты собственных исследований» состоит из пяти самостоятельных глав, включающих весь объем проведенных исследований.

Во второй главе дана детальная характеристика впервые выявленных больных туберкулезом в регионах СЗФО, включающая пол, возраст, место проживания, структуру клинических диагнозов, ВИЧ-статус. Установлено, что основными

диагнозами были инфильтративный и диссеминированный туберкулез легких; выявлены статистически значимые различия в структуре клинических диагнозов в зависимости от региона СЗФО.

Третья глава посвящена молекулярно-генетической характеристике, включая генотипическую лекарственную устойчивость, штаммов популяции возбудителя туберкулеза в восьми регионах СЗФО. Определена принадлежность штаммов *M. tuberculosis* к определенным генотипам, сполиготипам, MIRU-VNTR-типам. Важным результатом исследования являются полученные данные о неоднородности структуры субпопуляций *M. tuberculosis* Beijing в регионах СЗФО, но при этом отмечено, что во всех регионах встречаются штаммы кластеров Central Asian/Russian и B0/W148. Установлено, что у МЛУ-штаммов *M. tuberculosis*, независимо от региона, устойчивость к рифампицину и изониазиду была обусловлена преимущественно мутациями *rpoB* Ser531Leu и *katG* Ser315Thr соответственно.

В четвертой главе автор проводит сравнительный анализ фенотипической и генотипической устойчивости к основным противотуберкулезным препаратам штаммов *M. tuberculosis* различных генотипов, выявляет ассоциированные с множественной лекарственной устойчивостью генотипы/кластеры штаммов. Так, показано, что МЛУ-штаммы доминировали в кластерах 1071-32 (древняя сублиния), 4737-32 и 100-32 B0/W148, а также 1065-32 Central Asian/Russian ($p < 0,001$). При этом наиболее многочисленный кластер 94-32 Central Asian/Russian в равных долях включал ЛЧ и МЛУ штаммы. Отдельно рассмотрены генотипы штаммов *M. tuberculosis*, выделенные от ВИЧ-позитивных больных с впервые выявленным туберкулезом. Отмечен повышенный в 1,5 раза риск выявления МЛУ-ТБ в группе ВИЧ-инфицированных лиц ($RR=1,51 [1,13-2,03]$).

В пятой главе представлены разработки ускоренных способов генотипирования штаммов генетического семейства Beijing и предложен алгоритм исследования популяции *M. tuberculosis*, что является, несомненно, ценным

практическим результатом работы и может применяться для проспективного скрининга, ретроспективной оценки больших коллекций штаммов и в целом для микробиологического и эпидемиологического мониторинга МЛУ-ТБ.

В шестой главе автором описаны мутации, определяющие резистентность к бедаквилину серийных изолятов *M. tuberculosis*. Существенным результатом этой главы является то, что генетические маркеры устойчивости к бедаквилину (несинонимические однонуклеотидные замены, вставки, делеции, дупликация) выявлены только в генах *mmpR5* (*Rv0678*) и *atpE* (*Rv1305*) у 44,2% изолятов *M. tuberculosis* Beijing, полученных от 6 из 11 пациентов. При этом у пациентов, в изолятах *M. tuberculosis* которых мутации в генах *mmpR5* (*Rv0678*) и *atpE* (*Rv1305*) не были обнаружены, курсы лечения оказались эффективными и привели к прекращению бактериовыделения.

В разделе «Заключение» проанализированы полученные результаты, дана их оценка с использованием сведений научной литературы, подчеркнута их теоретическая и практическая значимость. Выводы полностью соответствуют цели и задачам диссертационной работы Вязовой А.А., аргументированы, подтверждены достоверными данными, полученными в ходе исследования.

В разделе «Практические рекомендации» автором определены основные предложения, которые могут представлять интерес для научного сообщества, специалистов эпидемиологической службы и практического здравоохранения, что позволит в перспективе регламентировать алгоритм популяционных исследований *M. tuberculosis*.

Автореферат диссертационного исследования Вязовой А.А. отражает содержание, результаты и выводы диссертационной работы в необходимом объёме, соответствует тексту диссертации, в достаточной степени иллюстрирован рисунками и таблицами. Диссертация и автореферат оформлены согласно требованиям ГОСТ 7.0.11-2011.

Таким образом, диссертационная работа Вязовой А.А. является завершённым научным исследованием, которое по научно-практической значимости, объёму исследований, новизне и ценности полученных результатов соответствует требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук.

Соответствие специальности

По тематике, методам исследования, научным положениям и выводам диссертационная работа Вязовой А.А. соответствует паспорту специальности научных работников 1.5.11 – микробиология (биологические науки) и области исследования: пункты 1 – «Проблемы эволюции микроорганизмов, установление их филогенетического положения», 3 – «Морфология, физиология, биохимия и генетика микроорганизмов», 4 – «Исследование микроорганизмов на популяционном уровне».

Принципиальных замечаний по работе нет, имеются незначительные технические опечатки, которые не снижают общего положительного впечатления. В процессе ознакомления с диссертацией возник вопрос: «Как можно объяснить неравномерность распределения генотипов в гетерогенных популяциях *M. tuberculosis* в субъектах Северо-Западного Федерального округа?»

Заключение

Диссертационная работа Вязовой Анны Александровны на тему: «Генетическая структура популяции и множественная лекарственная устойчивость *Mycobacterium tuberculosis*», представленная на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.11 – микробиология, является законченным научным трудом и содержит решение актуальной научной проблемы – получение новых знаний о штаммах *M. tuberculosis* циркулирующих на территории Северо-Запада России, с учетом критериев оценки генетической структуры и характеристики лекарственной устойчивости возбудителя туберкулеза, что поможет решению задач современной медицины, связанных с

эпидемиологией и терапией туберкулеза. По актуальности, новизне и практической значимости диссертационная работа Вязовой Анны Александровны полностью отвечает требованиям пунктов 9 - 14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 года (с изменениями в соответствии с Постановлениями Правительства Российской Федерации от 21.04.2016 № 335, от 02.08.2016 № 748, от 29.05.2017 № 650, от 28.08.2017 № 1024, от 01.10.2018 № 1168, от 26.05.2020 № 751, от 20.03.2021 № 426, от 11.09.2021 № 1539, от 26.09.2022 № 1690, от 26.01.2023 № 101, от 18.03.2023 № 415 «О внесении изменений в Положение о присуждении ученых степеней»), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора биологических наук, а ее автор, Вязовая Анна Александровна, заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.11 – микробиология.

Официальный оппонент:

Главный научный сотрудник отдела проблем лабораторной диагностики туберкулеза и патоморфологии Государственного бюджетного учреждения здравоохранения города Москвы «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы» (107076, Москва, ул. Стромынка, д.10, Тел.: +7 (916) 688-98-25, e-mail: makarova75@yandex.ru)

Доктор биологических наук

Макарова Марина Витальевна

Подпись М.В. Макаровой заверяю:

И.о. ученого секретаря Государственного бюджетного учреждения здравоохранения города Москвы «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы» (107076, Москва, ул. Стромынка, д.10, Тел.: +7 (499) 268-00-05, e-mail: cbt@zdrav.mos.ru)

Доктор медицинских наук



Слогоцкая Людмила Владимировна